秦巴山区中华蜜蜂种群微卫星 DNA 遗传分析

郭慧萍，周姝婧，朱翔杰，徐新建，于瀛龙，杨凯杰，陈道印，周冰峰*

（福建农林大学蜂学学院，福州 350002）

摘要：【目的】中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 是一种兼有生态价值和经济价值的授粉昆虫。本研究拟揭示秦巴山区中华蜜蜂种群遗传多态性现状，探讨中华蜜蜂的种群分化机制及其影响因素。【方法】使用 8 个微卫星 DNA 标记评估秦巴山区 17 个样点共 979 个蜂群的中华蜜蜂遗传多态性，以长白山中华蜜蜂和阿坝中华蜜蜂作为外群进行种群遗传分化分析。【结果】秦巴山区中华蜜蜂 95% 的差异来源于样点内，样点间遗传分化系数(*Fst*)为 0.002 ~ 0.037，基因流参数 *Nm* 为 6.51 ~ 124.75，与外群的遗传分化分析中均显示秦巴山区中华蜜蜂不存在遗传分化。平均期望杂合度(*He*)为 0.6877 ± 0.1098，平均观察杂合度(*Ho*)为 0.6364 ± 0.1367，平均有效等位基因数(*Ne*)为 3.7488 ± 1.6201 个，平均等位基因数(*Na*)为 7.71 ± 2.52 个，多态信息含量(*PIC*)为 0.6418 ± 0.1152，香农指数(*I*)为 1.5026 ± 0.3754，这些参数均表明微卫星遗传多态性丰富。中蜂囊状幼虫病流行过的地区，其杂合度、多态信息含量以及等位基因数均显著低于未发病地区。【结论】秦巴山区中华蜜蜂种群数量大，分布均匀，基因流水平高，在 650 km 距离范围内没有发生种群分化；秦巴山区中华蜜蜂微卫星遗传多态性丰富，仅部分地区中华蜜蜂遗传多态性受中蜂囊状幼虫病的选择压而降低。

关键词： 中华蜜蜂；遗传分化；遗传多态性；种群；微卫星标记

中图分类号： Q968　　**文献标识码：** A　　**文章编号：** 0454-6296(2016)03-0337-09

Population genetic analysis of *Apis cerana cerana* from the Qinling-Daba Mountain Areas based on microsatellite DNA

GUO Hui-Ping, ZHOU Shu-Jing, ZHU Xiang-Jie, XU Xin-Jian, YU Ying-Long, YANG Kai-Jie, CHEN Dao-Yin, ZHOU Bing-Feng* (College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract:【Aim】The Chinese honeybee (*Apis cerana cerana*) plays vital roles in pollination for agro-ecosystem and honey bee products. This study aims to investigate the population differentiation and genetic polymorphism among *Apis cerana cerana* populations across the Qinling-Daba Mountain Areas, and to explore possible factors contributing to genetic differentiation and difference of genetic polymorphism.【Methods】The genetic relationship was studied, and polymorphism was estimated among 979 colonies of *A. c. cerana* from 17 localities combined with two outgroups, *A. c. cerana* colonies from Changbai Mountain and Aba, based on eight microsatellite loci.【Results】The results showed that up to 95% of the variation was observed within sampling localities while less variation between localities. The genetic differentiation coefficient (*Fst*) among 17 localities ranged from 0.002 to 0.037, and the gene flow (*Nm*) was from 6.51 to 124.75, indicating that no population differentiation was detected. The mean expected heterozygosity (*He*), observed heterozygosity (*Ho*), number of alleles (*Na*), number of effective alleles (*Ne*), polymorphism information content (*PIC*) and Shannon's information index (*I*)

基金项目：国家现代蜂产业技术体系建设专项资金（CARS-45-KXJ11）

作者简介：郭慧萍，女，1990 年 2 月生，湖北武汉人，硕士研究生，研究方向为蜜蜂种群遗传学，E-mail：925102503@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：bingfengfz@126.com

收稿日期 Received：2015-12-21；接受日期 Accepted：2016-02-22

were 0.6877 ± 0.1098, 0.6364 ± 0.1367, 7.71 ± 2.52, 3.7488 ± 1.6201, 0.6418 ± 0.1152 and 1.5026 ± 0.3754, respectively, suggesting the abundant genetic polymorphism. The values of the genetic polymorphism indices including the expected heterozygosity, number of alleles, number of effective alleles and polymorphism information content were significantly lower in localities which underwent Chinese sacbrood virus pandemic recently than those in the virus uninfected areas. 【Conclusion】In the context of the large population size and continuous distribution in Qinling-Daba Mountain Areas, there is no genetic differentiation among *A. c. cerana* populations across a distance of 650 km owing to a high level of gene flow. And the results also imply that the honeybee in Qinling-Daba Mountain Areas has rich genetic polymorphism. Significantly decreased polymorphism occurs in some localities that have undergone selective pressure from Chinese sacbrood virus prevalence.

Key words: *Apis cerana cerana*; genetic differentiation; genetic polymorphism; population; microsatellite markers

种群遗传学是研究种群遗传分化、遗传结构、遗传特征、遗传多态性的科学(王崇云, 2007)。研究种群遗传分化与特征,了解遗传资源现状是资源开发利用和遗传育种的前提。遗传多态性丰富是进化的基础,有利于生物适应新环境的改变。评估遗传多态性水平和探究其影响因素,是保护和利用遗传资源的必要条件(陈灵芝和马克平, 2001)。

微卫星标记广泛存在于真核生物基因组中,具有共显性、多态性高等特点,被广泛地应用于种群遗传多态性的检测(韩海斌等, 2013; Loucifayad *et al*., 2015)、评估基因渗透(Harpur *et al*., 2012, 2013; De la Rúa *et al*., 2013)、研究种群遗传结构与特征(Llewellyn *et al*., 2003; Oleksa *et al*., 2011)、分析遗传分化及其机制等(张志春等, 2013; 张鹏飞等, 2015)。

蜜蜂是重要的授粉昆虫,对生物多样性及促进农牧业增产具有重要的价值和意义(Kremen *et al*., 2007)。我国中华蜜蜂长期适应于本土生态环境,相比于引进的西方蜜蜂具有抗螨害、耐寒、善于利用零星蜜粉源等优点(龚一飞和张其康, 2000)。借鉴西方蜜蜂分子标记研究我国中华蜜蜂种群遗传分化,明确了海南(徐新建等, 2013a)和长白山(张春香等, 2011; 于瀛龙等, 2013)的中华蜜蜂遗传分化,探讨了环境异质性以及地理阻碍对基因流的影响。然而,地理距离对连续分布的中华蜜蜂种群遗传分化的影响研究还未涉及。中华蜜蜂微卫星多态性的研究尚处于初始阶段,仅分析了黄土高原(徐新建等, 2013b)、沂蒙山区(陈晶等, 2008a)、南昌(陈晶等, 2008b)、皖南山区(殷玲等, 2008)、武夷山(朱翔杰等, 2011a)、福建(朱翔杰等, 2011b)、海南(徐新建等, 2013a)、浙江(曹联飞等, 2013)和长白山(于瀛龙等, 2013)等局部地区,中华蜜蜂微卫星的期望杂合度水平为 0.21 ~ 0.73。外来引种、疾病(于瀛龙等, 2013; 徐新建等, 2013a)、蜜粉源(陈晶等, 2008a, 2008b; 徐新建等, 2013b)、人工选育(朱翔杰等, 2011b; 曹联飞等, 2013)等因素可能影响中华蜜蜂的遗传多态性。

秦巴山区位于我国的中西部,介于 102°54′ ~ 112°40′E 和 30°50′ ~ 34°59′N 之间,总面积约 22.23×10^4 km^2,地跨陕西、甘肃、四川、湖北、河南及重庆等省市(白红英, 2014)。秦巴山区植被良好,中华蜜蜂数量较多,是研究大面积相似生境条件下,中华蜜蜂种群遗传多态性和遗传分化的理想场所。

本研究采用微卫星标记,分析秦巴山区中华蜜蜂的种群分化与遗传结构,尝试解决在生境相似、中华蜜蜂连续分布的条件下,地理距离与种群分化的关系。评估秦巴山区中华蜜蜂微卫星多态性水平,分析中蜂囊状幼虫病对中华蜜蜂遗传多态性的影响,以便全面掌握秦巴山区中华蜜蜂遗传资源现状与特征,为利用和保护中华蜜蜂遗传资源奠定基础理论。

1 材料方法

1.1 供试昆虫

在秦巴山区 17 个采样地点,共 979 个原始饲养的中华蜜蜂蜂群中采集工蜂样本。原始饲养的中华蜜蜂处于半野生状态,不进行人工育王,相比活框饲养的中华蜜蜂样本的代表性好。采样时,打开原始蜂巢在巢内的边缘取样或在巢门口捉取工蜂。秦岭山脉中的陕西西南部和甘肃东南部的中华蜜蜂在采样前 5 年内曾发生严重的中蜂囊状幼虫病(表 1)。以长白山和阿坝各 1 个采样地点的样本作为研究遗传分化的外群对照。

表 1　本研究中华蜜蜂 19 个采样地点的样本信息

Table 1　Information of total nineteen collecting sites of *Apis cerana cerana* in this study

样本代码 Sample code	采集地点 Collecting site	采样群数 Number of colonies sampled	经纬度 Latitude and longitude	海拔(m) Altitude
MJ	甘肃麦积 Maiji, Gansu *	63	34°17.601′N; 106°01.447′E	1 610
HX	甘肃徽县 Huixian, Gansu *	50	33°59.793′N; 106°05.034′E	1 167
FX	陕西凤县 Fengxian, Shaanxi *	52	34°07.977′N; 106°58.871′E	1 641
WB	陕西渭滨 Weibin, Shaanxi *	57	34°20.536′N; 107°01.447′E	752
TB	陕西太白 Taibai, Shaanxi *	54	34°03.603′N; 107°23.983′E	1 655
LB	陕西留坝 Liuba, Shaanxi *	53	33°34.557′N; 106°57.079′E	957
NS	陕西宁陕 Ningshan, Shaanxi *	55	33°40.580′N; 108°18.838′E	1 390
NQ	陕西宁强 Ningqiang, Shaanxi *	59	32°47.229′N; 106°10.816′E	868
ZP	陕西镇平 Zhenping, Shaanxi	56	32°05.404′N; 109°25.006′E	1 130
SX	河南陕县 Shanxian, Henan	60	34°31.354′N; 111°22.460′E	782
NY	河南南阳 Nanyang, Henan	77	33°16.311′N; 111°31.056′E	224
WY	四川万源 Wanyuan, Sichuan	65	31°49.880′N; 108°21.326′E	1 529
QC	四川青川 Qingchuan, Sichuan	63	32°35.554′N; 104°44.134′E	1 535
NJ	四川南江 Nanjiang, Sichuan	62	32°37.226′N; 107°00.584′E	976
WS	重庆巫山 Wushan, Chongqing	52	31°12.620′N; 109°45.341′E	691
CK	重庆城口 Chengkou, Chongqing	50	31°40.073′N; 108°11.000′E	881
YY	重庆云阳 Yunyang, Chongqing	51	30°43.705′N; 108°47.534′E	543
CBS	吉林长白山 Changbai Mountain, Jilin	38	42°32.581′N; 128°30.563′E	725
AB	四川阿坝 Aba, Sichuan	67	31°53.271′N; 102°07.934′E	2 717

* 表示经历过中蜂囊状幼虫病 Having suffered from Chinese sacbrood virus.

1.2　基因组 DNA 的提取与扩增

每群使用 1 头工蜂样本进行基因组的提取与微卫星扩增（Harpur *et al.*, 2012; Chahbar *et al.*, 2013）。利用 Ezup 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取蜜蜂基因组,利用 ExTaq Hot Start Version 扩增试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司, 大连]对 8 个微卫星标记扩增（Michel *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2009）(表 2),PCR 的扩增体系参照徐新建等(2013a)的研究,PCR 产物经 ABI 3730xl 自动测序仪(美国 ABI)进行毛细管电泳和等位基因分型(GeneMapper 4.0)。

表 2　8 对微卫星标记引物信息

Table 2　Primers of eight microsatellite markers

位点 Locus	引物序列(5′-3′) Primer sequences	退火温度(℃) Annealing temperature	GenBank 登录号 GenBank accession no.
A313	F: TAGCGCCCTAACGTCCAAC R: CCCTTCTACCACCGACGC	58	AJ509504
Ac-1	F: GCTACACTACCGCGACCTGCA R: TACGCTCCGTTAGTCCCGCTG	58	AB363803
Ac-2	F: CGTCACTACCCCTCGTCCTCG R: GAAGACAGAGTGAAAACGGCA	58	AB363804
Ac-5	F: TGGCCGAAGAACGGTGTTACG R: GAAAGAAAGAGTCGGTGGTGT	58	AB363806
Ac-26	F: AACCTTCTTCGCCACCTCCAA R: GTCTGAACGAAAGAAAGAGCA	58	AB363809
Ac-35	F: TTCCAGCAGGAAGTGACGGTG R: CGGGAAACTCGTCATTTTCGA	58	AB363814
Ap085	F: GATCAAACACACAAACGAAAGC R: ACCGGAAGCCTAATCAAGG	58	AJ509359
AT101	F: GCGTTCCAAGTGAATGAACA R: GTTGGCTATTTTCGTATCGC	58	AJ509549

1.3 数据统计与分析

利用 Excel Micro-Satellite Toolkit 3.1 (Park, 2001)软件计算观察杂合度(*Ho*)、期望杂合度(*He*)和等位基因数(*Na*),PopGene 1.31 软件分析样点有效等位基因数(*Ne*)和香农指数(*I*)。GenAlEx 6.5 软件进行主成分分析(PCA)和 AMOVA 分析(Peakall and Smouse, 2012),Genepop on Web 在线软件分析样点间的遗传分化系数(*Fst*)(Rousset, 2008),由遗传分化系数 *Fst* 计算基因流参数 *Nm*, $Nm = 1/4(1/Fst - 1)$ (Slatkin *et al*., 1989; Wang *et al*., 2015)。使用 Poptree 2 构建系统发生树, Structure 2.3.4 软件分析基因遗传结构(Pritchard *et al*., 2000)。

2 结果

2.1 秦巴山区中华蜜蜂种群遗传分化

根据秦巴山区中华蜜蜂样点间的遗传分化系数、遗传距离、遗传结构分析、主成分分析和系统发生树构建等研究结果,证明各样点间的中华蜜蜂均未发生种群遗传分化。

秦巴山区中华蜜蜂样点间遗传分化系数为 0.002 ~ 0.037;遗传距离为 0.029 ~ 0.215(表 3)。AMOVA 分析结果表明高达 95% 的变异来源来自于样点内部个体间。根据遗传分化系数计算的基因流参数 *Nm* 值为 6.51 ~ 124.75,表明各样点间的基因流大,没有导致遗传分化。

将吉林省长白山和四川省阿坝样本作为外群与秦巴山区中华蜜蜂样点进行遗传结构分析,秦巴山区各样点的中华蜜蜂遗传结构相似,与 2 个外群的遗传结构差别明显(图 1)。

主成分分析表明秦巴山区的中华蜜蜂没有分化。第 1 主成分与第 2 主成分贡献率分别为 57.44% 和 27.96%,秦巴山区中华蜜蜂紧密的聚在一起,与长白山、阿坝中华蜜蜂分化明显(图 2)。

聚类分析表明秦巴山区的中华蜜蜂没有分化,在聚类树上聚在一起,与长白山、阿坝中华蜜蜂明显分化(图 3)。

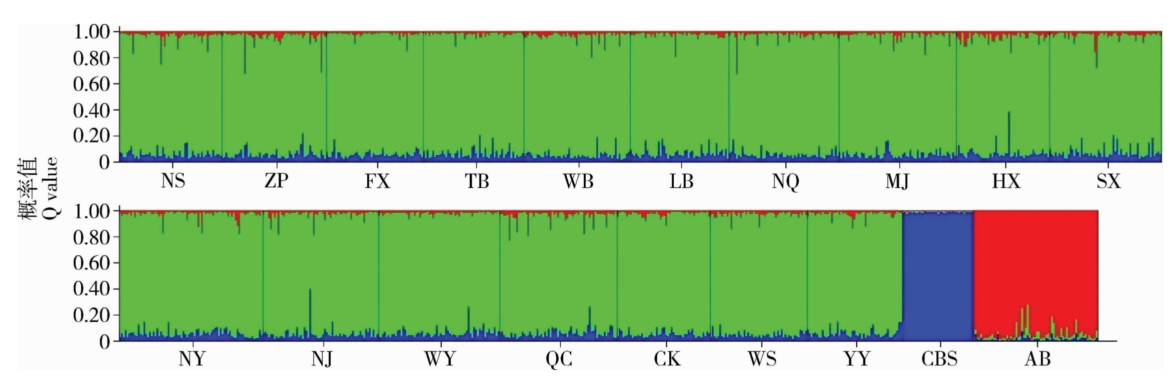


图 1 秦巴山区、长白山和阿坝中华蜜蜂的遗传结构分析

Fig. 1 Genetic structure analysis of *Apis cerana cerana* from the Qinling-Daba Mountain Areas, Changbai Mountain and Aba

样本代码同表 1。The sample codes same as in Table 1.

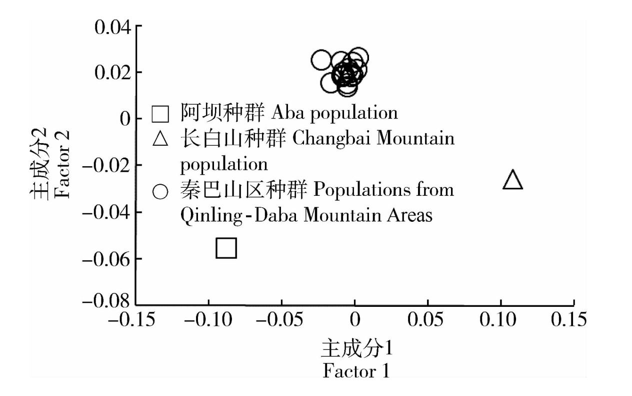


图 2 秦巴山区、长白山和阿坝中华蜜蜂主成分分析

Fig. 2 Principal component analysis of *Apis cerana cerana* from the Qinling-Daba Mountain Areas, Changbai Mountain and Aba

2.2 秦巴山区中华蜜蜂的多态性分析

秦巴山区中华蜜蜂从期望杂合度、观察杂合度、等位基因数、有效等位基因数、多态信息含量和香农指数等 6 个多态性参数分析,微卫星遗传多态性水平较高。严重病害能够降低中华蜜蜂的遗传多态性。

2.2.1 秦巴山区中华蜜蜂的多态性:秦巴山区中华蜜蜂期望杂合度为 0.6497 ~ 0.7288,观察杂合度为 0.5686 ~ 0.7078,等位基因数为 6.75 ~ 8.75,有效等位基因数为 3.2659 ~ 4.4277,多态信息含量为 0.6012 ~ 0.6791,香农指数为 1.3766 ~ 1.6813(表 4)。这 6 项多态性参数均能表明秦巴山区中华蜜蜂的多态性丰富。

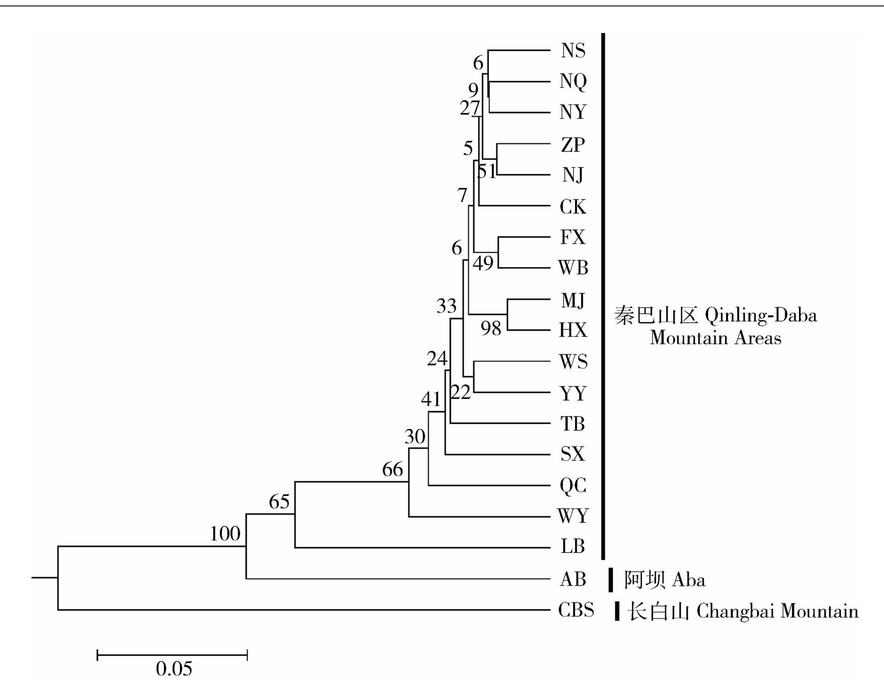


图 3　秦巴山区、长白山和阿坝中华蜜蜂 UPGMA 聚类图

Fig. 3　UPGMA dendrogram of *Apis cerana cerana* in the Qinling-Daba Mountain Areas, Changbai Mountain and Aba

标尺表示遗传距离。The scale bar represents the genetic distance.

表 3　秦巴山区样点间中华蜜蜂种群遗传距离和遗传分化系数

Table 3　Genetic distance and genetic differentiation coefficient between samples of *Apis cerana cerana* in Qinling-Daba Mountain Areas

样本代码 Sample code	NS	ZP	FX	TB	WB	LB	NQ	MJ	HX	SX	NY	NJ	WY	QC	CK	WS	YY
NS	–	0.042	0.046	0.058	0.038	0.163	0.041	0.048	0.043	0.067	0.042	0.043	0.069	0.084	0.045	0.052	0.058
ZP	0.013	–	0.062	0.062	0.041	0.165	0.047	0.063	0.054	0.052	0.044	0.035	0.091	0.080	0.045	0.059	0.049
FX	0.014	0.023	–	0.061	0.034	0.166	0.052	0.060	0.062	0.081	0.071	0.057	0.084	0.091	0.056	0.071	0.073
TB	0.023	0.023	0.022	–	0.057	0.166	0.059	0.069	0.072	0.080	0.063	0.060	0.088	0.100	0.075	0.079	0.088
WB	0.013	0.013	0.006	0.028	–	0.161	0.040	0.051	0.049	0.067	0.053	0.046	0.080	0.090	0.050	0.061	0.051
LB	0.004	0.013	0.013	0.010	0.013	–	0.161	0.167	0.166	0.182	0.157	0.163	0.215	0.169	0.172	0.173	0.174
NQ	0.010	0.018	0.016	0.021	0.011	0.008	–	0.052	0.048	0.066	0.040	0.050	0.082	0.075	0.050	0.057	0.065
MJ	0.012	0.026	0.019	0.019	0.016	0.005	0.010	–	0.029	0.075	0.051	0.060	0.096	0.081	0.059	0.068	0.069
HX	0.006	0.015	0.021	0.020	0.018	0.004	0.007	0.005	–	0.063	0.047	0.059	0.105	0.075	0.057	0.061	0.066
SX	0.019	0.012	0.021	0.027	0.023	0.012	0.025	0.028	0.023	–	0.057	0.060	0.130	0.098	0.067	0.082	0.087
NY	0.017	0.010	0.026	0.019	0.023	0.008	0.011	0.015	0.014	0.016	–	0.041	0.093	0.067	0.045	0.044	0.048
NJ	0.017	0.003	0.021	0.019	0.023	0.015	0.028	0.030	0.022	0.019	0.014	–	0.087	0.078	0.050	0.040	0.046
WY	0.027	0.019	0.032	0.029	0.032	0.030	0.024	0.037	0.027	0.033	0.021	0.020	–	0.134	0.080	0.093	0.100
QC	0.023	0.002	0.029	0.029	0.019	0.014	0.020	0.028	0.019	0.021	0.010	0.013	0.026	–	0.067	0.077	0.076
CK	0.015	0.016	0.018	0.022	0.015	0.006	0.007	0.013	0.005	0.025	0.014	0.020	0.020	0.007	–	0.062	0.054
WS	0.010	0.005	0.019	0.026	0.015	0.010	0.019	0.022	0.012	0.015	0.009	0.005	0.016	0.008	0.009	–	0.050
YY	0.015	0.007	0.026	0.030	0.015	0.011	0.023	0.025	0.015	0.030	0.012	0.009	0.016	0.004	0.009	0.002	–

对角线上三角为遗传距离（*Da*），下三角为遗传分化系数（*Fst*）。Genetic distance is above the diagonal, while the genetic differentiation coefficient is below the diagonal.

2.2.2　中蜂囊状幼虫病对中华蜜蜂多态性的影响：宁陕、凤县、太白、渭滨、留坝、宁强、麦积、徽县等样点的中华蜜蜂发生过严重中蜂囊状幼虫病，其期望杂合度（$t = -4.81671$, $P = 0.00023$）、多态信息含量（$t = -4.50899$, $P = 0.00042$）、有效等位基因数（$t = -3.07693$, $P = 0.00767$）极显著地低于未发病样点，等位基因数（$t = -2.45342$, $P = 0.02686$）也显著低于未发病样点。

表 4 秦巴山区中华蜜蜂遗传多态性

Table 4 Genetic polymorphism of *Apis cerana cerana* from the Qinling-Daba Mountain Areas

样本代码 Sample code	期望杂合度 *He*	观察杂合度 *Ho*	多态信息含量 *PIC*	等位基因数 *Na*	有效等位基因数 *Ne*	香农指数 *I*
NS	0.6618 ±0.1411	0.6383 ±0.1119	0.6202 ±0.1426	7.25 ±2.38	3.8483 ±2.0735	1.5062 ±0.3759
FX	0.6721 ±0.1189	0.6168 ±0.1098	0.6216 ±0.1258	6.75 ±2.25	3.5246 ±1.6467	1.4074 ±0.3598
TB	0.6567 ±0.1087	0.6196 ±0.0785	0.6095 ±0.1097	7.50 ±2.14	3.4561 ±1.3654	1.4787 ±0.2726
WB	0.7010 ±0.1066	0.6549 ±0.1341	0.6567 ±0.1132	7.50 ±2.88	3.9319 ±1.3680	1.5768 ±0.3595
LB	0.6759 ±0.1144	0.7078 ±0.1300	0.6363 ±0.1194	8.29 ±3.04	3.4621 ±2.0440	1.3766 ±0.6641
NQ	0.6620 ±0.1051	0.6114 ±0.1298	0.6203 ±0.1097	7.75 ±2.49	3.5964 ±1.5375	1.5385 ±0.3132
MJ	0.6547 ±0.1242	0.5686 ±0.1626	0.6107 ±0.1252	7.25 ±1.49	3.2756 ±1.2817	1.3954 ±0.3157
HX	0.6497 ±0.1214	0.5861 ±0.1926	0.6012 ±0.1259	7.13 ±1.73	3.2659 ±1.4573	1.3774 ±0.3227
ZP	0.7143 ±0.0847	0.6959 ±0.1444	0.6691 ±0.0916	8.50 ±2.67	3.9763 ±1.4265	1.6060 ±0.2992
SX	0.7207 ±0.0791	0.6212 ±0.1448	0.6791 ±0.0863	8.75 ±2.38	4.1691 ±1.1746	1.6813 ±0.2544
NY	0.7028 ±0.0934	0.6810 ±0.1281	0.6587 ±0.1017	7.88 ±2.80	3.8312 ±1.7262	1.5204 ±0.3272
NJ	0.6972 ±0.1165	0.6023 ±0.1081	0.6538 ±0.1188	8.00 ±2.51	3.7509 ±1.4690	1.5119 ±0.3438
WY	0.6755 ±0.1383	0.5948 ±0.2052	0.6263 ±0.1528	7.75 ±3.45	3.8500 ±2.0319	1.4386 ±0.3438
QC	0.7288 ±0.0932	0.6465 ±0.0975	0.6572 ±0.1001	8.00 ±3.55	3.5500 ±1.8817	1.3778 ±0.5896
CK	0.6862 ±0.1110	0.6704 ±0.1253	0.6446 ±0.1186	7.50 ±2.93	3.7034 ±1.7841	1.5021 ±0.3585
WS	0.7196 ±0.0962	0.6915 ±0.1954	0.6766 ±0.0987	7.38 ±1.41	4.1107 ±1.5431	1.5881 ±0.3073
YY	0.7127 ±0.1146	0.6109 ±0.1258	0.6693 ±0.1188	7.88 ±2.70	4.4277 ±1.7312	1.6611 ±0.3383
平均值 Mean	0.6877 ±0.1098	0.6364 ±0.1367	0.6418 ±0.1152	7.71 ±2.52	3.7488 ±1.6201	1.5026 ±0.3754

表中数据为平均值 ± 标准差。Data in the table are means ± *SD*.

发生病害的样点,微卫星 8 个位点等位基因均发生不同程度丢失,其中 Ac-2 和 AT101 等位基因丢失最多,分别丢失 50% 和 35.2%。发病组与未发病组多态性 6 个多态性参数均值比较均显著降低;比较单个位点的 6 个多态性参数,在 Ac-2 位点均显著低于未发病区,Ac-2 和 Ac-5 位点的多态信息含量及 Ac-2, Ap085, AT101 和 Ac-1 位点观察杂合度显著低于未发病区(表 5)。

表 5 中蜂囊状幼虫病发病区与未发病区中华蜜蜂微卫星多态性差异

Table 5 Differences in genetic polymorphism of eight microsatellite loci in *Apis cerana cerana* between Chinese sacbrood disease infected and uninfected areas

位点 Locus	等位基因种类 *All*[a]		期望杂合度 *He*		观察杂合度 *Ho*		多态信息含量 *PIC*		等位基因数 *Na*		有效等位基因数 *Ne*		香农指数 *I*	
	发病 Infected	未发病 Uninfected	发病 Infected	未发病 Uninfected	发病 Infected	未发病 Uninfected	发病 Infected	未发病 Uninfected	发病 Infected	未发病 Uninfected	发病 Infected	未发病 Uninfected	发病 Infected	未发病 Uninfected
Ac-35	12	13	0.77	0.79	0.77	0.73	0.72	0.75	9.00	9.89	4.63	4.85	1.72	1.80
Ac-2	9	18	0.57**	0.71**	0.57*	0.70*	0.53**	0.67**	7.00	8.33	2.46**	3.61**	1.25**	1.55**
Ap085	15	18	0.85	0.86	0.74*	0.80*	0.82	0.83	11.50	13.00	6.77	7.23	2.11	2.17
Ac-26	10	13	0.69	0.69	0.65	0.69	0.64	0.64	7.13	6.89	3.30	3.52	1.45	1.39
Ac-5	10	11	0.55	0.62	0.57	0.60	0.50*	0.58*	6.88	7.33	2.49	2.94	1.20	1.36
A313	17	18	0.58	0.59	0.58	0.56	0.55	0.55	10.38	10.11	2.58	2.60	1.42	1.38
AT101	11	17	0.72	0.75	0.42**	0.44**	0.67	0.67	7.38	8.44	3.37	3.70	1.33	1.45
Ac-1	6	7	0.62	0.65	0.65*	0.64*	0.55	0.59	5.25	5.44	2.76	2.99	1.19	1.25
平均值 Mean	11.25	14.38	0.67**	0.71**	0.62*	0.65*	0.62**	0.66**	8.06**	8.68**	3.55**	3.93**	1.46	1.54

* $P<0.05$; ** $P<0.01$.

3 讨论

3.1 地理距离与中华蜜蜂种群遗传分化的关系

理论上,大范围连续分布的种群,随地理距离加大,会由于基因流的逐渐减少而导致遗传分化(Barton *et al*., 2010),对于不同生物而言多远的距离会产生遗传分化仍处于探索阶段。随分子数据分析地理隔离方法的出现(Bohanak, 2002),该领域的研究受到较多关注,特别是生活史短或营固着生活

的生物（Hurtrez-Boussès *et al*., 2010；Husemann *et al*., 2012；Gu *et al*., 2015）。秦巴山区蜜粉源植物丰富，主要以中山和低山为主（白红英，2014），生境相似，地理距离是唯一有可能影响中华蜜蜂种群遗传分化的因素，因此，是研究遗传分化与地理距离的天然理想实验场所。

Wright（1978）提出，当 $Fst < 0.05$，表明种群间弱分化或没分化。本研究中，所有样点间遗传分化系数 *Fst* 值为 0.002 ~ 0.037，直线距离最远的四川青川和河南陕县间约为 650 km，两者间 *Fst* 值为 0.021，四川万源与甘肃麦积 *Fst* 值最大，为 0.037，均小于 0.05，因此认为秦巴山区中华蜜蜂未发生遗传分化。同时，AMOVA 分析显示 95% 的变异来源于样本内，聚类分析和遗传结构分析结果也支持了这个观点。基因流参数 $Nm > 1$ 表示基因流足以防止遗传分化的发生（Slatkin and Barton, 1989；Wang *et al*., 2015），在西方蜜蜂的研究中 $Nm > 2$ 即表示不存在遗传分化（Nikolova *et al*., 2015），而本研究中 *Nm* 为 6.51 ~ 124.75。说明在种群连续分布，环境均质的条件下，中华蜜蜂种群发生遗传分化的距离要大于 650 km。

中华蜜蜂婚飞常发生在 10 km 以外，平原可达 18 km 左右（周冰峰，2002），秦巴山区中华蜜蜂种群数量大，且连续分布，未产生分化的主要原因很可能是样点间存在较高的基因流。我国中华蜜蜂分布生态区域内基本不存在比秦巴山区更大的同质环境，我们推测在中国的生态环境下，在中华蜜蜂连续分布区域内仅由地理距离因素导致的中华蜜蜂种群遗传分化的可能性很小。

3.2　秦巴山区中华蜜蜂的遗传多态性水平

种内的遗传多态性是一个物种对抗外界干扰能否成功反应的决定因素（陈灵芝和马克平，2001），对于培育新的优良品种具有重要意义。期望杂合度是度量种群遗传多态性常用的参数，Takezaki 和 Nei（1996）提出微卫星计算的期望杂合度在 0.3 ~ 0.8 之间可说明种群遗传多态性较高。秦巴山区中华蜜蜂微卫星遗传多态性平均期望杂合度为 0.6877，在已经报道的文献中中华蜜蜂期望杂合度为 0.21 ~ 0.73（徐新建等，2013a，2013b；于瀛龙等，2013），且本研究中使用的 AT101 和 Ap085 位点在长白山（于瀛龙等，2013）、武夷山（朱翔杰等，2011a）、海南（徐新建等，2013a）、福建（朱翔杰等，2011b）、南昌（陈晶等，2008b）等地区的研究中也有涉及，2 个位点的期望杂合度分别为 0.1780 ~ 0.7001 和 0.1427 ~ 0.8880，均低于秦巴山区在 2 个位点上的期望杂合度（0.7337 和 0.8542），说明秦巴山区中华蜜蜂微卫星遗传多态性丰富，是我国中华蜜蜂遗传资源保护和利用的重要地区。

3.3　中蜂囊状幼虫病导致秦巴山区中华蜜蜂遗传多态性降低的原因

影响蜜蜂微卫星遗传多态性的因素很多，主要有选择压力、突变、迁移扩散等（Zayed, 2009），选择压力对种群遗传多态性的影响又是生物学家普遍关注的问题（Harpur *et al*., 2012；Jara *et al*., 2015）。中蜂囊状幼虫病是严重危害中华蜜蜂的病毒性疾病，流行时蜂群的死亡率常达 50% 以上（王双进，2008）。这种毁灭性疾病的流行对于中华蜜蜂的生存发展而言是一种较为强烈的选择压，疾病对遗传多态性的影响根本原因是个体的死亡造成等位基因丧失，最终导致遗传多态性的降低。本研究区域种群数量大，总体遗传多态性丰富，但流行过中蜂囊状幼虫病的样点，微卫星遗传多态性显著低于未发病区域，部分位点出现大量的等位基因丢失的现象，如 Ac-2 在发病区与未发病区等位基因数由 18 种减少为 9 种，充分说明中蜂囊状幼虫病的选择强度足以降低中华蜜蜂的遗传多态性。

致谢　在样本采集中得到吉林省养蜂科学研究所薛运波、牛庆生，安图县长白山中蜂场杨明福，甘肃省养蜂研究所张世文、祁文忠，四川省蜂业管理站王建文、王顺海和李念周等，陕西省榆林市种蜂场刘新宇，河南科技学院张中印，重庆市畜牧科学院蜂业研究所戴荣国等大力支持。福建农林大学蜂学学院王青、赖康、徐细建、叶善斌、施金虎、夏晓翠和应品芳等参与部分采样工作，本科生王恒、夏凤枝、赵伟和李玲玉等参与部分实验。在此表示感谢！

参考文献（References）

Bai HY, 2014. The Response of Forest Vegetation in Qinling and Daba Mountain Ranges to Environmental Changes. Science Press, Beijing. 1 – 5. [白红英, 2014. 秦巴山区森林植被对环境变化的响应. 北京: 科学出版社. 1 – 5]

Barton NH, Briggs DEG, Eisen JA, Goldstein DB, Patal NH, 2010. Evolution. Gold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. 675 – 676.

Bohanak AJ, 2002. IBD (isolation by distance): a program for analyses of isolation by distance. *J. Hered*., 93(2): 153 – 154.

Cao LF, Su XL, Zhao DX, Hua QY, Hu FL, 2013. Genetic diversity of microsatellite DNA for *Apis cerana cerana* in Zhejiang. *Apiculture of China*, 64(2): 10 – 11. [曹联飞, 苏晓玲, 赵东绪, 华启云, 胡

福良, 2013. 浙江中华蜜蜂微卫星遗传多样性分析. 中国蜂业, 64(2): 10 – 11]

Chahbar N, Munoz I, Dall'Olio R, De la Rúa P, Serrano J, Doumandji S, 2013. Population structure of North African honey bees is influenced by both biological and anthropogenic factors. *J. Insect Conserv.*, 17: 385 – 392.

Chen J, Chen GH, Ji T, Yin L, Liu M, 2008a. Study on microsatellite genetic polymorphism of *Apis cerana cerana* population from Yimeng mountain. *Apiculture of China*, 59(4): 11 – 14. [陈晶, 陈国宏, 吉挺, 殷玲, 刘敏, 2008a. 沂蒙山中华蜜蜂微卫星 DNA 遗传多样性分析. 中国蜂业, 59(4): 11 – 14]

Chen J, Ji T, Yin L, Liu M, Chen GH, 2008b. Analysis on genetic polymorphism of *Apis cerana cerana* population in Nanchang region with microsatellite marker. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 36(18): 7600 – 7601. [陈晶, 吉挺, 殷玲, 刘敏, 陈国宏, 2008b. 利用微卫星标记分析南昌地区中华蜜蜂遗传多样性. 安徽农业科学, 36(18): 7600 – 7601]

Chen LZ, Ma KP, 2001. Biodiversity Science: Principles and Practice. Shanghai Science and Technology Press, Shanghai. 93 – 122. [陈灵芝, 马克平, 2001. 生物多样性科学: 原理与实践. 上海: 上海科学技术出版社. 93 – 122]

De la Rúa P, Jaffé R, Muñoz I, Serrano J, Moritz RF, Kraus FB, 2013. Conserving genetic diversity in the honeybee: comments on Harpur *et al*. (2012). *Mol. Ecol.*, 22: 3208 – 3210.

Gong YF, Zhang QK, 2000. Classification and Evolution of *Apis*. Fujian Science and Technology Press, Fuzhou. 21 – 26. [龚一飞, 张其康, 2000. 蜜蜂分类与进化. 福州: 福建科学技术出版社. 21 – 26]

Gu QH, Husemann M, Ding BQ, Luo Z, Xiong BX, 2015. Population genetic structure of *Bellamya aeruginosa* (Mollusca: Gasropoda: Viviparidae) in China: weak divergence across large geographic distances. *Ecol. Evol.*, 5(21): 4906 – 4919.

Han HB, Zhou XR, Pang BP, Zhang MZ, Li HP, 2013. Microsatellite marker analysis of the genetic diversity of *Oedaleus asiaticus* (Orthoptera: Acrididae) populations in Inner Mongolia, northern China. *Acta Entomol. Sin.*, 56(1): 79 – 87. [韩海斌, 周晓榕, 庞保平, 张敏哲, 李海平, 2013. 内蒙古亚洲小车蝗种群遗传多样性的微卫星分析. 昆虫学报, 56 (1): 79 – 87]

Harpur BA, Minaei S, Kent CF, Zayed A, 2012. Management increases genetic diversity of honey bees via admixture. *Mol. Ecol.*, 21: 4414 – 4421.

Harpur BA, Minaei S, Kent CF, Zayed A, 2013. Admixture increases diversity in managed honey bees: reply to De la Rúa *et al*. (2013). *Mol. Ecol.*, 22: 3211 – 3215.

Hurtrez-Boussès S, Hurtrez JE, Turpin H, Durand C, Durand P, De Meeus T, Meunier C, Renaud F, 2010. Hydrographic network structure and population genetic differentiation in a vector of fasciolosis, *Galba truncatula*. *Infect. Genet. Evol.*, 10(2): 178 – 183.

Husemann M, Ray JW, King RS, Hooser EA, Danley PD, 2012. Comparative biogeography reveals differences in population genetic structure of five species of stream fishes. *Biol. J. Linn. Soc.*, 107: 867 – 885.

Jara L, Muñoz I, Cepero A, Martín-Hernández R, Serrano J, Higes M, De la Rúa P, 2015. Stable genetic diversity despite parasite and pathogen spread in honey bee colonies. *Sci. Nat.*, 102 (9 – 10): 1 – 8.

Kremen C, William NM, Aizen MA, Gemmill-Herren B, LeBuhn G, Minckley R, Packer L, Potts SG, Roulton T, Steffan-Dewenter I, Vazquez DP, Winfree R, Adams L, Crone EE, Greenleaf SS, Keitt TH, Klein AM, Regetz J, Ricketts TH, 2007. Pollination and other ecosystem service produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. *Ecol. Lett.*, 10(4): 299 – 314.

Llewellyn KS, Loxdale HD, Harrington R, Brookes CP, Clark SJ, 2003. Migration and genetic structure of the grain aphid (*Sitobion avenae*) in Britain related to climate and clonal fluctuation as revealed using microsatellites. *Mol. Ecol.*, 12(1): 21 – 34.

Loucifayad W, Achou M, Legout H, Alburaki M, Garnery L, 2015. Genetic assessment of Algerian honeybee populations by microsatellite markers. *Apidologie*, 46: 392 – 402.

Michel S, Florence M, Vautrin D, Monnerot M, Cornuet JM, 2007. A third-generation microsatellite-based linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, and is comparison with the sequence-based physical map. *Genome Biol.*, 8: 66 – 77.

Nikolova SR, Bienkowska M, Gerula D, Ivanova EN, 2015. Microsatellite DNA polymorphism in selectively controlled *Apis mellifera carnica* and *Apis mellifera caucasica* populations from Poland. *Arch. Biol. Sci.*, 67(3): 889 – 894.

Oleksa A, Chybicki I, Tofilski A, Burczyk J, 2011. Nuclear and mitochondrial patterns of introgression into native dark bees (*Apis mellifera mellifera*) in Poland. *J. Apicul. Res.*, 50: 116 – 129.

Park SD, 2001. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. PhD Dissertation, University of Dublin, Dublin, Ireland.

Peakall R, Smouse PE, 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28: 2537 – 2539.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P, 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945 – 959.

Rousset F, 2008. Genepop' 007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.*, 8: 103 – 106.

Slatkin M, Barton NH, 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 43 (43): 1349 – 1368.

Takahashi JI, Shimizu S, Koyama S, Kimura K, Shimizu I, Yoshida T, 2009. Variable microsatellite loci isolated from the Asian honeybee, *Apis cerana* (Hymenoptera; Apidae). *Mol. Ecol. Resour.*, 9(3): 819 – 821.

Takezaki N, Nei M, 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, 144: 389 – 399.

Wang CY, 2007. Evolutionary Ecology. Higher Education Press, Beijing. 126 – 152. [王崇云, 2007. 进化生态学. 北京: 高等教育出版社. 126 – 152]

Wang P, Zhang M, Liu J, Xu L, Liu W, 2015. Genetic diversity and structure of *Libanotis buchtormensis* (Fisch.) DC. in disjunct populations along the bilateral sides of deserts in northwestern China. *Plant Sys. Evol.*, 301(9): 2219 - 2230.

Wang SJ, 2008. Breeding of queens resistant to Chinese Sacbrood Virus by five steps. *Apiculture of China*, 59(10): 48. [王双进, 2008. 五步法培育抗中囊病蜂王. 中国蜂业, 59(10): 48]

Wright S, 1978. Evolution and the Genetics of Population, Vol. 4. Variability within and among Natural Population. University of Chicago Press, Chicago and London.

Xu XJ, Zhou SJ, Zhu XJ, Zhou BF, 2013a. Microsatellite DNA genetic diversity of *Apis cerana cerana* in Hainan Island, southern China. *Acta Entomol. Sin.*, 56(5): 554 - 560. [徐新建, 周姝婧, 朱翔杰, 周冰峰, 2013a. 海南岛中华蜜蜂遗传多样性的微卫星 DNA 分析. 昆虫学报, 56(5): 554 - 560]

Xu XJ, Zhou SJ, Zhu XJ, Zhou BF, 2013b. Microsatellite DNA genetic diversity of *Apis cerana cerana* from the Loess Plateau, Northwest China. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 42(6): 638 - 642. [徐新建, 周姝婧, 朱翔杰, 周冰峰, 2013b. 黄土高原中华蜜蜂遗传多样性的微卫星 DNA 分析. 福建农林大学学报(自然科学版), 42(6): 638 - 642]

Yin L, Ji T, Chen J, Chen GH, Liu M, 2008. Study on genetic diversity of *Apis cerana cerana* populations from mountainous areas in South Anhui by microsatellite makers. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 29(4): 19 - 22. [殷玲, 吉挺, 陈晶, 陈国宏, 刘敏, 2008. 利用微卫星标记分析皖南山区中华蜜蜂遗传多样性. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 29(4): 19 - 22]

Yu YL, Zhou SJ, Xu XJ, Zhu XJ, Zhou BF, 2013. Analysis on genetic diversity of *Aspis cerana cerana* in Changbai Mountains. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 42(6): 643 - 647. [于瀛龙, 周姝婧, 徐新建, 朱翔杰, 周冰峰, 2013. 长白山中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)遗传多样性分析. 福建农林大学学报(自然科学版), 42(6): 643 - 647]

Zayed A, 2009. Bee genetics and conservation. *Apidologie*, 40: 237 - 262.

Zhang CX, Zhang XF, Chen TZ, Teng YZ, Liu WZ, Jiang YS, 2011. Analysis of genetic diversity in twelve honeybee populations based on AFLP technique. *Scientia Agricultura Sinica*, 44(18): 3877 - 3885. [张春香, 张学锋, 陈廷珠, 滕跃中, 刘文忠, 姜玉锁, 2011. 基于 AFLP 技术的 12 个蜜蜂种群的遗传多样性分析. 中国农业科学, 44(18): 3877 - 3885]

Zhang PF, Zhou XR, Pang BP, Chang J, Shan YM, Zhang ZR, 2015. Microsatellite marker analysis of the genetic diversity of *Galeruca daurica* (Coleoptera: Chrysomelidae) populations from Inner Mongolia. *Acta Entomol. Sin.*, 58(9): 1005 - 1011. [张鹏飞, 周晓榕, 庞保平, 常静, 单艳敏, 张卓然, 2015. 内蒙古沙葱萤叶甲种群遗传多样性的微卫星分析. 昆虫学报, 58(9): 1005 - 1011]

Zhang ZC, Luo GH, Zhang GF, Han GJ, Liu BS, Fang JC, 2013. Genetic diversity of different geographical populations of *Sesamia inferens* as determined by AFLP. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(3): 693 - 699. [张志春, 罗光华, 张谷丰, 韩光杰, 刘宝生, 方继朝, 2013. 大螟不同地理种群的 APFL 遗传分析. 应用昆虫学报, 50(3): 693 - 699]

Zhou BF, 2002. The Bee Breeding Management. Xiamen University Press, Xiamen, Fujian. 15 - 16. [周冰峰, 2002. 蜜蜂饲养管理学. 福建厦门: 厦门大学出版社. 15 - 16]

Zhu XJ, Xu XJ, Zhou SJ, Wu XD, Zhou BF, 2011a. Genetic analysis of *Apis cerana cerana* in Wuyi Mountain Nature Reserve based on microsatellite DNA. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 26(6): 935 - 940. [朱翔杰, 徐新建, 周姝婧, 吴显达, 周冰峰, 2011. 武夷山自然保护区中华蜜蜂微卫星 DNA 遗传分析. 福建农业学报, 26(6): 935 - 940]

Zhu XJ, Zhou BF, Wu XD, Xu XJ, Xia XC, 2011b. Genetic diversity of *Apis cerana cerana* in Fujian based on microsatellite markers. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 40(4): 407 - 411. [朱翔杰, 周冰峰, 吴显达, 徐新建, 夏晓翠, 2011. 福建中华蜜蜂微卫星标记的遗传多样性分析. 福建农林大学学报(自然科学版), 40(4): 407 - 411]

(责任编辑：袁德成)